

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 6 :</b> <b>C12N 15/12, C12Q 1/68, C12N 5/10, A61K 48/00, 38/17, G01N 33/50, C07K 14/47, 16/18</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/45428</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 15. Oktober 1998 (15.10.98)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP98/01994 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 6. April 1998 (06.04.98) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 97105688.2 7. April 1997 (07.04.97) EP <b>(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist:</b> DE usw. <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-68305 Mannheim-Waldhof (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> KUBBIES, Manfred [DE/DE]; Glaswandstrasse 7C, D-82377 Penzberg (DE). MACHL, Andreas [DE/DE]; Tegelbergstrasse 2, D-94469 Deggendorf (DE). PLANITZER, Simone [DE/DE]; Pasinger Strasse 54, D-12309 Berlin (DE). <b>(74) Anwälte:</b> WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> FANCONI-GEN II <b>(54) Bezeichnung:</b> FANCONI-GEN II <b>(57) Abstract</b> <p>The present invention relates to a pathophysiologically relevant Fanconi anemia (FA) associated gene, a polypeptide coded therefrom, an antibody directed against the polypeptide, and to the pharmaceutical applications of the nucleic acid, polypeptide and antibody.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein pathophysiologisch relevantes Fanconi-Anämie (FA)-assoziiertes Gen, ein davon codiertes Polypeptid, einen gegen das Polypeptid gerichteten Antikörper sowie die pharmazeutische Anwendung der Nucleinsäure, des Polypeptids und des Antikörpers.</p>		

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Fanconi-Gen II

### Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft ein pathophysiologisch relevantes Fanconi-Anämie (FA)-assoziiertes Gen, ein davon codiertes Polypeptid, einen gegen das Polypeptid gerichteten Antikörper sowie die pharmazeutische Anwendung der Nucleinsäure, des Polypeptids und des Antikörpers.

FA ist eine seltene genetische Erkrankung, die durch progressive Pancytopenie, kongenitale Abnormitäten und ein erhöhtes Risiko für Tumorerkrankungen gekennzeichnet ist (Glanz und  
15 Fraser, J.Med.Genet. 19 (1982) 412-416; Auerbach und Allen, Cancer Genet.Cytogenet. 51 (1991) 1-12). Sie tritt bei etwa einer von 300.000 Personen auf.

Obwohl die molekulare Basis der Erkrankung unbekannt ist, liefert die Hypersensitivität gegenüber der clastogenen Wirkung von DNA-Quervernetzungsmitteln einen guten Marker für den FA-Genotyp (Auerbach und Wolmann, Nature 261 (1976), 494-496). Zellen aus FA-Patienten zeigen multiple Chromatidbrüche und -austausche nach Kontakt mit Mitomycin C (MMC) oder Diepoxybutan (DEB) in Konzentrationen, die eine geringe clastogene Wirkung auf normale Zellen haben (Sasaki und Tonomura, Cancer Res. 33 (1973), 1829-1836 und Auerbach, Exp. Hematol. 21 (1993), 731). Nach Inkubation von FA-Lymphozyten und Fibroblasten mit MMC ist ein Defekt in der G2-Phase des Zellzyklus ersichtlich, der sich sowohl in einer Verzögerung des G2-Phasenübergangs als auch in einem vollständigen Arrest äußert (Kubbies et al., Am.J.Hum.Genet. 37 (1985), 1022; Hoehn et al., Fanconi Anemia, Clinical, Cytogenic and Experimental Aspects (1989), Springer Verlag Berlin-Heidelberg; Seyschab et al., Blood 85 (1995), 2233-2237).

- 2 -

Gegenwärtig sind innerhalb der FA-Population mindestens 5 verschiedene Komplementationsgruppen bekannt (Duckworth-Rysiecki et al., Somatic Cell Mol. Genet. 11 (1985), 35; Strathdee et al., Nature 356 (1992), 763; Joenje et al., Blood 86 (1995), 2156-2160). Die Gene für die Komplementationsgruppen A und C wurden vor kurzem beschrieben (Strathdee et al., Nature 356 (1992), 763; Lo Ten Fol et al., Nature Genet. 14 (1996), 320-323); WO93/22435; Pronk et al., Nature Genet. 11 (1995), 338-340), aber die Art der molekularen Wirkungsweise der FA-A und FA-C Proteine sind noch unbekannt (Gavish et al., Am. J. Hum. Genet. 53 (1993), 685; Yamashita et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994), 6712; Youssoufian et al., J. Biol. Chem. 270 (1995), 9876-9882). Weiterhin wurde für die Komplementationsgruppe FAD die chromosomale Lokalisierung angegeben (Whitney et al., Nature Genet. 11 (1995), 341-343).

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand darin, neue Gene zu identifizieren, die in der DNA-Regulationskaskade beteiligt sind (z.B. Zellzyklusstörungen, DNA-Reparatur, Tumorgenese/Tumorprogression) und die mit dem pathophysiologischen Phänotyp der Fanconi-Anämie assoziiert sein können.

Die vorliegende Erfindung beschreibt die Identifizierung, Klonierung und Charakterisierung eines Gens, das als Fanconi-Gen II bezeichnet wird und für zwei neue Polypeptide codiert. Gefunden wurde diese Gensequenz unter Verwendung der Differential-Display-Technik (Liang und Pardee, Science 257 (1992), 967-971) im Vergleich von Normal-Fibroblasten und FA-Fibroblasten. Das Fanconi-Gen II wird nicht in FA-Fibroblasten aber in Normal-Fibroblasten exprimiert. Das Fanconi-Gen II, die davon codierten Polypeptide sowie gegen die Polypeptide gerichtete Antikörper sind als diagnostische, therapeutische oder präventive Mittel für Erkrankungen geeignet, die mit Störungen des Zellzyklus, der Zellaktivierung, der Zellzyklusprogression, der DNA-Reparatur, Cytopenien, Tumorgenese und Tumorprogression direkt oder indirekt assoziiert sind.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nucleinsäure, welche

- (a) die in SEQ ID NO. 1 dargestellte Nucleotidsequenz oder einen Protein-codierenden Abschnitt davon,
- 5 (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Nucleotidsequenz oder
- (c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Nucleotidsequenz umfaßt.

10

In der Datenbank EMBL EST sind drei cDNA-Sequenzen angegeben, W44613, W44574, g1664579, 1996, die Abschnitte der in SEQ ID NO. 1 angegebenen Nukleotidsequenz enthalten. Diese Sequenzen sind nicht Gegenstand der Erfindung. Sie offenbaren weder die  
15 vollständige erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, noch einen funktionellen Protein-codierenden Abschnitt davon, da durch das Fehlen eines Startcodons in allen drei Sequenzen kein offener Leserahmen offenbart ist. Weiterhin weisen die drei Sequenzen keine 5'-UTRs auf und enthalten Deletionen, welche  
20 Verschiebungen des Leserahmens mit sich bringen. Außerdem wird für die drei oben genannten Sequenzen keine biologische Funktion offenbart.

Die in SEQ ID NO. 1 dargestellte Nucleotidsequenz enthält zwei  
25 offene Leserahmen, die Polypeptide mit einer Länge von 223 Aminosäuren und 165 Aminosäuren entsprechen. Diese Polypeptide reichen von Aminosäure 1 bis 223 bzw. von Aminosäure 59 bis 223 der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Aminosäuresequenz.

30

In SEQ ID NO. 1 ist ein Nucleotid Y, d.h. C oder T an Position 491 und ein Nucleotid S, d.h. C oder G an Position 514.

Neben der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nucleotidsequenz und einer  
35 dieser Sequenz im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nucleotidsequenz umfaßt die vorliegende Erfindung auch noch eine Nucleotidsequenz, die mit einer der

zuvor genannten Sequenzen hybridisiert. Der Begriff "Hybridisierung" gemäß vorliegender Erfindung wird wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), 1.101-1.104) verwendet. Vorzugsweise spricht man von einer stringenten Hybridisierung, wenn nach Waschen für eine Stunde mit 1 X SSC und 0,1% SDS bei 50°C, vorzugsweise bei 55°C, besonders bevorzugt bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C, insbesondere für eine Stunde in 0,2 X SSC und 0,1% SDS bei 55°C, vorzugsweise bei 55°C, besonders bevorzugt bei 62°C und am meisten bevorzugt bei 68°C noch ein positives Hybridisierungssignal beobachtet wird. Eine unter derartigen Waschbedingungen mit der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nucleotidsequenz oder einer damit im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechenden Nucleotidsequenz hybridisierende Nucleotidsequenz ist eine erfindungsgemäße Nucleotidsequenz.

Vorzugsweise ist die erfindungsgemäße Nucleotidsequenz eine DNA. Sie kann jedoch auch eine RNA oder ein Nucleinsäureanalogon wie eine peptidische Nucleinsäure umfassen. Besonders bevorzugt umfaßt die erfindungsgemäße Nucleinsäure einen Protein-codierenden Abschnitt der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Nucleotidsequenz oder eine Sequenz, die eine Homologie von mehr als 80%, vorzugsweise mehr als 90% und besonders bevorzugt mehr als 95% zu der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Nucleotidsequenz oder einem vorzugsweise mindestens 20 nt. und besonders bevorzugt mindestens 50 nt. langen Abschnitt davon aufweist.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind die von einer Nucleinsäure wie oben angegebenen codierten Polypeptide. Diese Polypeptide weisen vorzugsweise (a) die in SEQ ID NO. 2 dargestellte Aminosäuresequenz von Aminosäure 1 bis 223, (b) die in SEQ ID NO. 2 dargestellte Aminosäuresequenz von Aminosäure 59 bis 223 oder (c) eine Homologie von mehr als 70%, vorzugsweise mehr als 80% und besonders bevorzugt mehr als 90% zu einer der Aminosäuresequenzen gemäß (a) oder (b)

auf.

Erfindungsgemäße Nucleinsäuren sind vorzugsweise aus Säugern und insbesondere aus dem Menschen erhältlich. Sie können nach bekannten Techniken unter Verwendung kurzer Abschnitte der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nucleotidsequenz als Hybridisierungs-  
5 sonden oder/und Primer nach bekannten Methoden isoliert werden. Weiterhin können erfindungsgemäße Nucleinsäuren auch durch chemische Synthese hergestellt werden, wobei anstelle  
10 der üblichen Nucleotidbausteine gegebenenfalls auch modifizierte Nucleotidbausteine, z.B. 2'-O-alkylierte Nucleotidbausteine eingesetzt werden können. Nucleinsäuren, die teilweise oder vollständig aus modifizierten Nucleotidbausteinen bestehen, können beispielsweise als therapeutische Mittel, z.B. als  
15 Antisense-Nucleinsäuren oder Ribozyme eingesetzt werden.

Weiterhin umfaßt die Erfindung auch Nucleinsäureanaloge wie etwa peptidische Nucleinsäuren, deren Basensequenz einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure entspricht.

20

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Vektor, der mindestens eine Kopie einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure enthält. Dieser Vektor kann ein beliebiger prokaryontischer oder eukaryontischer Vektor sein, auf dem sich die  
25 erfindungsgemäße DNA-Sequenz vorzugsweise unter Kontrolle eines Expressionssignals (Promotor, Operator, Enhancer etc.) befindet. Beispiele für prokaryontische Vektoren sind chromosomale Vektoren wie etwa Bakteriophagen und extrachromosomale Vektoren wie etwa Plasmide, wobei zirkuläre Plasmidvektoren  
30 besonders bevorzugt sind. Geeignete prokaryontische Vektoren sind z.B. bei Sambrook et al., Supra, Kapitel 1 - 4 beschrieben.

Besonders bevorzugt ist der erfindungsgemäße Vektor ein eukaryontischer Vektor, z.B. ein Hefevektor oder ein für höhere Zellen geeigneter Vektor (z.B. ein Plasmidvektor, viraler Vektor, Pflanzenvektor). Derartige Vektoren sind dem Fachmann

- 6 -

auf dem Gebiet der Molekularbiologie geläufig, so daß hier nicht näher darauf eingegangen werden muß. Insbesondere wird in diesem Zusammenhang auf Sambrook et al., Supra, Kapitel 16 verwiesen.

5

Neben den in SEQ ID NO.2 dargestellten Polypeptiden betrifft die Erfindung auch Muteine, Varianten und Fragmente davon. Darunter sind Sequenzen zu verstehen, die sich durch Substitution, Deletion oder/und Insertion einzelner Aminosäuren oder  
10 kurzer Aminosäureabschnitte von den in SEQ ID NO. 2 dargestellten Aminosäuresequenzen unterscheiden.

Unter den Begriff "Variante" fallen sowohl natürlich vorkommende allelische Variationen oder Spleißvariationen der Fan-  
15 coni-Polypeptide II sowie durch rekombinante DNA-Technologie (insbesondere in vitro-Mutagenese mit Hilfe von chemisch synthetisierten Oligonucleotiden) erzeugte Proteine, die hinsichtlich ihrer biologischen oder/und immunologischen Aktivität den in SEQ ID NO. 2 dargestellten Proteinen im wesentlichen entsprechen. Ebenfalls fallen unter diesen Begriff auch  
20 chemisch modifizierte Polypeptide. Hierzu gehören Polypeptide, die an den Termini oder/und an reaktiven Aminosäureseitengruppen durch Acylierung, z.B. Acetylierung, oder Amidierung modifiziert sind.

25

Die Erfindung betrifft auch einen Vektor, der mindestens einen 20 Nucleotide langen Abschnitt der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Sequenz enthält. Vorzugsweise besitzt dieser Abschnitt eine Nucleotidsequenz, die aus dem Protein-codierenden Bereich  
30 der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Sequenz oder einem für die Expression des Proteins wesentlichen Bereich stammt. Diese Nucleinsäuren eignen sich besonders zur Herstellung von therapeutisch einsetzbaren Antisense-Nucleinsäuren, die vorzugsweise bis zu 50 Nucleotide lang sind.

35

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, die mit einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure oder einem



erfindungsgemäßen Vektor transformiert ist. Die Zelle kann sowohl eine eukaryontische als auch eine prokaryontische Zelle sein. Verfahren zur Transformation von Zellen mit Nucleinsäuren sind allgemeiner Stand der Technik und brauchen daher nicht näher erläutert zu werden. Beispiele für bevorzugte Zellen sind eukaryontische Zellen, insbesondere tierische und besonders bevorzugt Säugerzellen.

Ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids oder Fragmenten dieses Polypeptids als Immunogen zur Herstellung von Antikörpern. Die Herstellung von Antikörpern kann dabei auf übliche Weise durch Immunisierung von Versuchstieren mit dem vollständigen Polypeptid oder Fragmenten davon und anschließende Gewinnung der resultierenden polyklonalen Antiseren erfolgen. Nach der Methode von Köhler und Milstein oder deren Weiterentwicklungen können aus den Antikörper-produzierenden Zellen der Versuchstiere auf bekannte Weise durch Zellfusion monoklonale Antikörper erhalten werden. Ebenso können nach bekannten Methoden humane monoklonale Antikörper hergestellt werden.

Als Immunogen bevorzugt sind die rekombinanten Fanconi II-Proteine oder Peptidfragmente, insbesondere N- oder C-terminale Peptide hiervon.

25

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Antikörper gegen die Fanconi II-Proteine oder Varianten davon, vorzugsweise Antikörper, die keine Kreuzreaktion mit anderen Fanconi-assoziierten Proteinen wie etwa dem FAC-Protein zeigen. Besonders bevorzugt sind Antikörper gegen die gesamten Polypeptide oder gegen eine Peptidsequenz gerichtet, die den Aminosäuren 1-40, 59-120 oder 205-223 der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Aminosäuresequenz entsprechen.

Die Bereitstellung der Fanconi II-Proteine, dafür codierender Nucleinsäuren und dagegen gerichteter Antikörper schaffen die Voraussetzung für eine gezielte Suche nach Effektoren dieser

Proteine. Stoffe, die auf das erfindungsgemäße Polypeptid inhibitorisch oder aktivierend wirken, sind in der Lage, die durch die Polypeptide gesteuerten Zellfunktionen selektiv zu beeinflussen. Daher können sie bei der Therapie entsprechender  
5 Krankheitsbilder wie z.B. Cytopenien oder Tumore eingesetzt werden. Ein Gegenstand der Erfindung ist somit auch ein Verfahren zur Identifizierung von Effektoren der Fanconi II-Proteine, wobei man Zellen, die das Protein exprimieren, mit verschiedenen potentiellen Effektorsubstanzen, z.B. nieder-  
10 molekularen Stoffen, in Kontakt bringt und die Zellen auf Veränderungen, z.B. zellaktivierende, zellinhibierende, zellproliferative oder/und zellgenetische Veränderungen, analysiert. Auf diese Weise lassen sich auch Bindetargets der Fanconi II-Proteine identifizieren.

15 Bei Krankheitsbildern, die auf einen Ausfall der Fanconi II-Proteine zurückzuführen sind, kann eine gentherapeutische Behandlung erfolgen, welche die Übertragung einer für die Fanconi Proteine-II codierenden Nucleinsäuren mittels Vektoren, z.B. viralen Vektoren, in das entsprechende Zielgewebe  
20 umfaßt. Andererseits kann bei Krankheitsbildern, die auf eine unkontrollierte Expression der Fanconi-Proteine II zurückzuführen sind, eine gentherapeutische Behandlung erfolgen, welche zu einer Blockierung dieser Expression führt.

25 Die vorgestellten Ergebnisse schaffen überdies die Voraussetzung für eine gezielte Diagnostik von Krankheiten, die mit Veränderungen der Aktivität der Fanconi-Proteine II ursächlich oder indirekt verbunden sind. Diese Untersuchungen können mit  
30 Hilfe spezifischer Nucleinsäuresonden zum Nachweis auf Nucleinsäureebene, z.B. auf Gen- oder Transkriptebe-  
ne, oder mit Hilfe von Antikörpern gegen die Fanconi-Proteine II zum Nachweis auf Polypeptidebene durchgeführt werden.

35 Die vorliegende Erfindung betrifft somit eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als aktive Komponenten Nucleinsäuren, Vektoren, Zellen, Polypeptide und Antikörper wie zuvor angege-

ben enthält.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann weiterhin pharmazeutisch übliche Träger-, Hilfs- oder/und  
5 Zusatzstoffe sowie gegebenenfalls weitere aktive Komponenten enthalten. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann insbesondere zur Diagnostik, Therapie oder Prävention von Erkrankungen eingesetzt werden, die mit Störungen des Zellzyklus, der Zellaktivierung, der Zellzyklusprogression, der DNA-Reparatur  
10 sowie mit Cytopenien, der Tumorgenese oder/und der Tumorprogression assoziiert sind. Weiterhin kann die erfindungsgemäße Zusammensetzung auch zur Diagnostik einer Prädisposition für solche Erkrankungen bei Individuen, insbesondere bei der Diagnostik eines Risikos für Cytopenien oder/und Tumorerkrankun-  
15 gen eingesetzt werden.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Diagnostik der oben genannten Erkrankungen, wobei man einen Patienten oder eine aus einem Patienten stam-  
20 mende Probe, z.B. eine Probe einer Körperflüssigkeit oder eines Gewebes, mit einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung in Kontakt bringt und die Nucleotidsequenz oder/und die Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäure qualitativ oder quantitativ bestimmt. Diese Bestimmungsmetho-  
25 den können beispielsweise auf Nucleinsäureebene durch Verwendung von Nucleinsäure-Hybridisierungs-sonden oder über Reverse Transkription/PCR bzw. auf Proteinebene durch Antikörper nach cyto- oder histochemischen Methoden erfolgen. Besonders bevorzugt ist die Verwendung der pharmazeutischen Zusammensetzung  
30 als Marker für das Auftreten von Cytopenien, Tumoren oder anderen proliferationsassoziierten Erkrankungen oder einer Prädisposition für die genannten pathophysiologischen Veränderungen.

35 Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Therapie oder Prävention einer der zuvor genannten Erkrankungen, wobei man dem Patienten eine erfindungsgemäße

- 10 -

pharmazeutische Zusammensetzung verabreicht, die die aktive Komponente in einer gegen die Erkrankung wirksamen Menge enthält. Spezifische Beispiele für pharmazeutische Zusammensetzungen, welche für therapeutische Zwecke geeignet sind, sind beispielsweise bispezifische Antikörper und Antikörper-Toxin- oder Antikörper-Enzymkonjugate. Weitere bevorzugte pharmazeutische Zusammensetzungen für therapeutische Zwecke sind Antisense-Nucleinsäuren, gentherapeutische Vektoren oder andere niedermolekulare Aktivatoren oder Inhibitoren.

10

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und Sequenzprotokolle näher erläutert. Es zeigen:

SEQ ID NO. 1 eine Nucleotidsequenz, die für das Fanconi-Gen  
15 II codierende genetische Information enthält,  
wobei ein größerer offener Leserahmen von  
Nucleotid 256 - 924 und ein kleinerer offener  
Leserahmen von Nucleotid 430 - 924 reicht, und  
SEQ ID NO. 2 die Aminosäuresequenzen der offenen Leserahmen  
20 der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nucleotidsequenz,  
wobei die Aminosäuresequenz des größeren offenen  
Leserahmens von Aminosäure 1 - 223 und die  
Aminosäuresequenz des kleineren offenen Leserahmens  
von Aminosäure 59 - 223 reicht.

25

### BEISPIELE

#### Beispiel 1:

#### 30 Kultivierung von Zellen

Primäre diploide humane Fibroblasten H94-38 und H94-17 wurden aus fötalem Lungengewebe isoliert und von D. Schindler (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Die H94-38 Zellen  
35 wurden durch Zellzyklusanalyse als Fanconi-Anämie-Phänotyp diagnostiziert und weisen eine verlängerte G2-Phase sowie einen Anstieg des G2-Phasenarrests bei Zugabe von MMC auf. Aus

- 11 -

Komplementationsuntersuchungen geht hervor, daß die H94-38 Zellen nicht zu den Fanconi-Komplementationsgruppen A, B, C und D, sondern vermutlich zur Komplementationsgruppe E gehören. H94-17 Kontrollzellen zeigen keine erhöhte MMC-Sensitivität.

Die Zellen wurden bei 37°C mit 7% CO<sub>2</sub> und 95% Feuchtigkeit in MEM Medium mit Earle's Salzen (BRL, Gaithersburg MD, USA) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (Hyclone, Logan, UT, USA) kultiviert. Zur RNA-Präparation wurden die Zellen durch Serumentzug (0,1%) synchronisiert und nach 48 h mit 10% fötalem Kälberserum stimuliert. Nach weiteren 30 h waren die Zellen subkonfluent und konnten für die RNA-Isolierung geerntet werden.

Zur Analyse des Zellzyklusstatus in einem Proliferationsassay wurden nach einer Kultivierungsdauer von 30 h in BrdU-haltigem Medium Aliquots dieser Zellkulturen entnommen. Mittels einer hochauflösenden flußzytometrischen BrdU-Hoechst-Quenchingtechnik wurden die Anzahl von Zellen in den Zellzyklusphasen G0/G1, S und G2/M wie von Kubbies (in Radbruch, A. (ed.), Flow Cytometry and Cell Sorting, Springer Verlag Berlin-Heidelberg 1992, pp 75-85) beschrieben bestimmt.

## Beispiel 2:

### mRNA Differential-Display

Für den mRNA Differential-Display wurde der RNA-Kit von Gen Hunter (Brookline, MA, USA) verwendet. Die Gesamt-RNA wurde aus synchronisierten Zellkulturen mit dem Tripure-Reagenz (Boehringer Mannheim GmbH, DE) gemäß der Vorschrift des Herstellers isoliert. Bis zur Verwendung wurde die RNA als Isopropanol-präzipitierte RNA-Pellets, bedeckt mit 70% Ethanol bei -80°C aufbewahrt. DNase I (Boehringer Mannheim GmbH) wurde zu 1-5 µg Gesamt-RNA in 1 X DNase I Reaktionspuffer gegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert.

- 12 -

Die RNA-Proben wurden durch Messung der Absorption bei 260 nm quantitativ bestimmt und auf einem Agarosegel analysiert. 0,2 µg Gesamt-RNA wurden für die reverse Transkription verwendet. Aus  $1 \times 10^6$  Fibroblasten wurden insgesamt 8 µg Gesamt-RNA isoliert.

Die reverse Transkription der RNA erfolgte in doppelten Ansätzen von jeweils 20 µl in 1 X reversem Transkriptionspuffer, jeweils 20 µM dNTPs und 2 µM jeweils der einbasigen Ankerprimer T<sub>11</sub>A, T<sub>11</sub>G oder T<sub>11</sub>C. Die Lösung wurde 5 min auf 65°C erwärmt, 10 min auf 37°C abgekühlt und dann wurden 100 U Moloney Murine Leukemiavirus (MMLV) Reverse Transkriptase zugegeben. Nach Inkubation für eine Stunde bei 37°C wurde das Gemisch für 5 min auf 75°C erhitzt und dann bei -20°C aufbewahrt.

Die PCR wurde in einer Reaktionslösung durchgeführt, die 1/10 Volumen des Ansatzes zur reversen Transkription, 2 µM dNTPs, 0,2 µM des jeweiligen T<sub>11</sub>N-Primers, 0,2 µM eines Primers mit willkürlich festgelegter Sequenz, 10 µCi α[<sup>35</sup>S]dATP und 1 U Taq-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim GmbH) enthielt. Die PCR wurde in einem Perkin-Elmer 2400 Gene Amp. PCR-System für insgesamt 40 Zyklen bei 94°C 30 sec, 40°C 2 min, 72°C 30 sec und schließlich 72°C für 5 min durchgeführt. Es wurden verschiedene willkürliche Primer von Gen Hunter (13-mer mit Hind-III Restriktionsstelle), Operon (Allameda CA, USA) und Genosys (The Woodlands, TX, USA) (jeweils 10-mer Primer mit 60-70% GC-Gehalt) verwendet.

Die Proben wurden in Sequenziergel-Beladungspuffer bei 80°C für 2 min vor der Auftrennung auf einen 5-6% denaturierenden Polyacrylamid-Sequenziergel denaturiert. Für jede Probe wurden doppelte PCR Ansätze durchgeführt und auf dem gleichen Polyacrylamidgel nebeneinander aufgetrennt. Das getrocknete Gel wurde autoradiographisch auf differentiell exprimierte Gene analysiert.

Reproduzierbare Banden, die differenziell exprimierten Genen

- 13 -

entsprechen, wurden aus dem Gel ausgeschnitten. Die cDNA wurde aus Gelstücken durch Kochen für 15 min in 100 µl sterilem Wasser eluiert. Die DNA im Überstand wurde durch Ethanolpräzipitation in Gegenwart von Glycogen gesammelt. Anschließend wurde die DNA zur Reamplifikation mit den entsprechenden Primern und PCR-Bedingungen wie oben angegeben verwendet, außer daß dNTP-Konzentrationen von 20 µM verwendet wurden und das Reaktionsgemisch keine Radioisotope enthielt.

Die auf diese Weise erhaltenen amplifizierten PCR-Fragmente wurden über ein Agarosegel aufgetrennt und durch Zentrifugation des entsprechenden Gelstücks in einem 0,45 µm Millipore Durapore Membranschlauch eluiert. Die Proben wurden für die Northern-Analyse bei -20°C aufbewahrt.

Auf diese Weise wurden mit 106 verschiedenen Primerkombinationen insgesamt 60 Banden, davon 43 reamplifizierte Banden erhalten, die in FA-Zellen und Kontrollzellen differentiell exprimierten Genen entsprechen. Diese differentielle Expression war reproduzierbar.

### Beispiel 3:

#### Northern-Analyse

Die Northern Blot Analyse wurde gemäß Standardprozeduren gemäß Sambrook et al. (1989), Supra durchgeführt. Die Nucleinsäuren wurden auf positiv-geladene Nylonmembranen (Boehringer Mannheim GmbH) durch nach unten gerichteten Kapillartransfer mit 10 X SSC transferiert und quervernetzt.

Spezifische Sonden wurden direkt aus dem PCR Reamplifikationsansatz durch Markierung mit dem Hi-Prime Markierungskit (Boehringer Mannheim GmbH) unter Verwendung von Hexamerprimern mit willkürlicher Sequenz markiert. Die Abtrennung freier Nucleotide erfolgte unter Verwendung von G50 Sephadex Schleudersäulen (Boehringer Mannheim GmbH).

- 14 -

Die auf diese Weise erzeugten Sonden wurden gegen Gesamt-RNA hybridisiert. Nach Hybridisierung für 16 - 20 h bei 42°C wurde der Filter 2 mal in 1 X SSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur für 15 min und anschließend in 1 X SSC 0,1% SDS bei 50°C für 1 h gewaschen. Dann wurden die Membranen autoradiographisch untersucht.

Die Northern-Analyse ergab eine differentielle Expression für ein etwa 1020 bp langes PCR-Fragment.

10

Northern-Analysen in Zellkultur- und Gewebeproben ergaben in Kontrollfibroblasten eine dominante Bande mit einer Länge von ca. 1 kb und oftmals eine weitere Bande oder singulär auftretende Bande mit einer Länge von ca. 700 bp, die vielleicht auf eine Spleißvariante zurückgeführt werden kann. In den untersuchten FA-Fibroblasten wurden diese Banden nicht gefunden. In der Tumorzelllinie Hela wurden beide Varianten stark exprimiert. In anderen Tumorzelllinien (z. B. Raji oder K562) wurde keine Expression gefunden. In Embryonalfibroblasten aus dem Knorpel der Augenpigmentschale wurde nur die größere Bande gefunden.

20

#### Beispiel 4:

Charakterisierung von DD-PCR-Fragmenten, die differentiell exprimierten mRNA-Spezies entsprechen

25

PCR-Fragmente, die sich im Northern Blot als differentiell erwiesen, wurden mittels dem TA Cloning Kit (INVITROGEN) nach Vorschrift des Herstellers in den Vektor pCR™2.1 ligiert und der E.coli Stamm INVαF' mit diesem Konstrukt transformiert. Klone, die das Plasmid aus differenziellem Fragment und Vektor enthielten, wurden gemäß Standardprozeduren nach Sambrook et al. (1989, Cold Spring Harbor University Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) kultiviert und die Plasmide isoliert.

35

Der 5'-Bereich der gefundenen Nucleotidsequenz wurde mittels



- 15 -

einer modifizierten NewRACE Technik (Frohmann, M. A. (1994). On Beyond Classic RACE. PCR Methods Applic 4:40-58.) amplifiziert. Hierzu wurde in Gegenwart von 20 % PEG/DMSO (1:1, w/v) an das 5' Ende der Gesamt-RNA der Kontrollzellen ein DNA/RNA-Oligonucleotid (5'-GTAAAACGACGGCCAGTAAAGCACTCTCCAGCCTCTCA CCGCrArArA-3') ligiert und die modifizierte RNA mit dem genspezifischen Primer SP1 (5'-AACAGAAAACAAGTTTAATGCAACAGGTGA-3') revers transkribiert. Das gesamte cDNA Transkript wurde mit einem Primer (5'-CACTCTCCAGCCTCTCACCGCAA-3') sowie dem genspezifischen Primer SB2 (5'-GCTGAGGCC GGCTGCAATGGA-3') amplifiziert und wie oben beschrieben in den Vektor pCR<sup>TM</sup>2.1 ligiert und sequenziert. Die Zugehörigkeit beider Fragmente zur selben mRNA wurde durch einen überlappenden Bereich von 380 Nucleotiden mit identischer Basenfolge und eine PCR mit außen liegenden Primern am 5'Ende des RACE Fragments (5'-TTTCACCGTCTAGAGGCATAAGAGG-3') und am 3'Ende des Differential Display Fragments (5'-AACAGAAAACAAGTTTAATGCAA CAGGTGA-3') mit dem Ergebnis der Sequenz des Fanconi Gens II erwiesen. Die dadurch erhaltene cDNA des Fanconi Gens II wurde wie oben beschrieben in den Vektor pCR<sup>TM</sup>2.1 ligiert und sequenziert. Mittels Northern Blot Analyse wie in Beispiel 3 beschrieben wurde die differenzielle Expression der gesamten Fanconi Gen II mRNA nachgewiesen.

#### 25 Beispiel 5:

##### Herstellung eines Expressionskonstrukts und Expression

Exemplarisch wird hier die Expression der langen Variante des FA-II Gens beschrieben. Das Verfahren ist aber ebenso gültig für die verkürzte Form des FA-II Gens.

Das im Beispiel 4 beschriebene FA-II Gen, welches für die Aminosäuresequenz 1-223 von SEQ ID NO. 2 kodiert, wurde nach Standardverfahren (Sambrook, Fritsch, Maniatis, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, 1989) in den eukaryontischen Expressionsvektor pCDNA3 umklo-

- 16 -

niert (Invitrogen). Die Regulation der Expression geschieht durch den CMV Promotor/Enhancer und das BGH polyA Signal. Als Selektionsgen wird das Neo-Gen verwendet (unter Kontrolle der SV40 Expressionskassette).

5

Für die Herstellung einer stabilen, FA-II exprimierenden Zelllinie wurden CHO Zellen verwendet. Dabei wurden 20 µg Lipofectamin (Gibco; in 750 µl MEM-alpha Medium) mit 10 µg DNA (in 750 µl MEM-alpha Medium) gemischt, 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 6 ml MEM-alpha Medium ver-  
10 dünt. Dieses Gemisch wurde für 6 Stunden auf  $5 \times 10^6$  CHO Zellen in T75 Zellkulturflaschen (Nunc) in MEM-alpha Medium (Gibco) gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen mit MEM-alpha/10% FKS (fötales Kälberserum)  
15 gewaschen und in frischem Medium für 48 Stunden bei 37°C kultiviert. Danach wurde durch Zugabe von 1 mg/ml Neomycin (G418, Boehringer Mannheim) der Selektionsdruck angelegt. Die überlebenden Zellen wurden mittels FACS (Becton Dickinson) als Einzelzellen in 96-er Well Zellkulturplatten (Nunc) mit fri-  
20 schem Medium kloniert und unter G418 Selektionsdruck weiter kultiviert, bis ein stabil transfizierter CHO Klon etabliert war.

Unter Verwendung von DHFR als Selektionsgen kann neben der  
25 Gewinnung einer stabil transfizierten CHO Zelllinie zusätzlich eine Genamplifikation des FA-II Gens erreicht werden.

#### Beispiel 6:

##### 30 Antikörperherstellung

Wie schon in Beispiel 5, wird hier exemplarisch die Antikörperherstellung mit der langen Variante des FA-II Proteins beschrieben. Das Verfahren ist ebenso gültig für die verkürzte  
35 Form des FA-II Proteins.

BALB/c Mäuse wurden mit rekombinantem, humanem FA-II Protein

- 17 -

mit der Aminosäuresequenz 1 - 223 von SEQ ID NO. 2 (hergestellt in CHO Zellen) intraperitoneal immunisiert. Die Erstimmunisierung erfolgte in komplettem Freund'schen Adjuvans und alle weiteren Immunisierungen wurden in inkomplettem Freund'schen Adjuvans durchgeführt. Die Dosis betrug 50 - 100 µg. Folgeimmunisierungen wurden in ca. 4-wöchigem Abstand durchgeführt, bis ein Serumtiter von 1:50000 erreicht ist.

Anschließend erfolgte die Immortalisierung der Milzzellen der immunisierten Tiere mit der Myelomzelllinie P3XX63.Ag8.653. Die Fusion wurde nach Standardverfahren durchgeführt (J. Immunol. Methods 39 (1980), 285-308). Das Fusionsverhältnis Milzzellen zu Myelomzelle war dabei 1:1. Die Fusionsprodukte wurden auf 24-er Zellkulturschalen (Nunc) in HA-Medium auf RPMI/10% FKS Basis (Boehringer Mannheim) ausgesät. Positive Primärkulturen wurden 2 Wochen nach Fusion mittels FACS (Becton Dickinson) als Einzelzellen in 96-er Zellkulturplatten (Nunc) in RPMI/10% FKS kloniert.

Zur Gewinnung der monoklonalen Antikörper wurden die so erhaltenen Hybridomzellklone in vivo expandiert. Dazu wurden  $5 \times 10^6$  Hybridomzellen intraperitoneal in mit Pristan (Sigma Chemical Company) vorbehandelte Mäuse inokkuliert. Nach 10-21 Tagen wurden je Maus 2-3 ml Ascites entnommen und daraus der monoklonale Antikörper nach herkömmlichen Methoden gewonnen.

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH  
 (B) STRASSE: Sandhofer Str. 112-132  
 (C) ORT: Mannheim  
 10 (E) LAND: Deutschland  
 (F) POSTLEITZAHL: 68305

## (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Fanconi-Gen II

15

## (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible  
 20 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30  
 (EPA)

## 25 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1026 Basenpaare  
 (B) ART: Nucleotid  
 30 (C) STRANGFORM: beides  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
 35 (B) LÄNGE: 256..924

## (ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
 40 (B) LÄNGE: 430..924

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

TTTCACCGTC TAGAGGCATA AGAGGTGAGC CCGTGCTCTT CAGCGGAGAA GATCCCCTAC	60
45 CTGGCCGCGG GCCACTTTCT GTGGGCCGTG GGGTCCTCAA GGAGACGGCC CTTGGGCTCA	120
GGGGCTGCGT TTCCACACGC GCCTTTCCCA GGGCTCCCGC GCGCGTTCCT GCCTGGCCGC	180
CGGCCGCTCC AACAGCAGCA CAAGGCGGGA CTCAGAACCG GCGTTCAGGG CCGCCAGCGG	240
50 CCGCGAGGCC CTGAG ATG AGG CTC CAA AGA CCC CGA CAG GCC CCG GCG GGT	291
Met Arg Leu Gln Arg Pro Arg Gln Ala Pro Ala Gly	
1 5 10	
55 GGG AGG CGC GCG CCC CGG GGC GGG CGG GGC TCC CCC TAC CGG CCA GAC	339
Gly Arg Arg Ala Pro Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp	
15 20 25	

- 19 -

	CCG GGG AGA GGC GCG CGG AGG CTG CGA AGG TTC CAG AAG GGC GGG GAG	387
	Pro Gly Arg Gly Ala Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys Gly Gly Glu	
	30 35 40	
5	GGG GCG CCG CGC GCT GAC CCT CCC TGG GCA CCG CTG GGG ACG ATG GCG	435
	Gly Ala Pro Arg Ala Asp Pro Pro Trp Ala Pro Leu Gly Thr Met Ala	
	45 50 55 60	
	CTG CTC GCC TTG CTG CTG GTC GTG GCC CTA CCG CGG GTG TGG ACA GAC	483
10	Leu Leu Ala Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg Val Trp Thr Asp	
	65 70 75	
	GCC AAC CYG ACT GCG AGA CAA CGA GAT CCA SAG GAC TCC CAG CGA ACG	531
15	Ala Asn Xaa Thr Ala Arg Gln Arg Asp Pro Xaa Asp Ser Gln Arg Thr	
	80 85 90	
	GAC GAG GGT GAC AAT AGA GTG TGG TGT CAT GTT TGT GAG AGA GAA AAC	579
	Asp Glu Gly Asp Asn Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg Glu Asn	
	95 100 105	
20	ACT TTC GAG TGC CAG AAC CCA AGG AGG TGC AAA TGG ACA GAG CCA TAC	627
	Thr Phe Glu Cys Gln Asn Pro Arg Arg Cys Lys Trp Thr Glu Pro Tyr	
	110 115 120	
25	TGC GTT ATA GCG GCC GTG AAA ATA TTT CCA CGT TTT TTC ATG GTT GCG	675
	Cys Val Ile Ala Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala	
	125 130 135 140	
	AAG CAG TGC TCC GCT GGT TGT GCA GCG ATG GAG AGA CCC AAG CCA GAG	723
30	Lys Gln Cys Ser Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu	
	145 150 155	
	GAG AAG CGG TTT CTC CTG GAA GAG CCC ATG CCC TTC TTT TAC CTC AAG	771
35	Glu Lys Arg Phe Leu Leu Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys	
	160 165 170	
	TGT TGT AAA ATT CGC TAC TGC AAT TTA GAG GGG CCA CCT ATC AAC TCA	819
	Cys Cys Lys Ile Arg Tyr Cys Asn Leu Glu Gly Pro Pro Ile Asn Ser	
	175 180 185	
40	TCA GTG TTC AAA GAA TAT GCT GGG AGC ATG GGT GAG AGC TGT GGT GGG	867
	Ser Val Phe Lys Glu Tyr Ala Gly Ser Met Gly Glu Ser Cys Gly Gly	
	190 195 200	
45	CTG TGG CTG GCC ATC CTC CTG CTG CTG GCC TCC ATT GCA GCC GGC CTC	915
	Leu Trp Leu Ala Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu	
	205 210 215 220	
	AGC CTG TCT TGAGCCACGG GACTGCCACA GACTGAGCCT TCCGGAGCAT	964
50	Ser Leu Ser	
	GGACTCGCTC CAGACCGTTG TCACCTGTTG CATTAACTT GTTTTCTGTT GAAAAAAAAA	1024
55	AA	1026
60		
65		

- 20 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 223 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Arg Leu Gln Arg Pro Arg Gln Ala Pro Ala Gly Gly Arg Arg Ala  
 1 5 10 15  
 Pro Arg Gly Gly Arg Gly Ser Pro Tyr Arg Pro Asp Pro Gly Arg Gly  
 20 25 30  
 Ala Arg Arg Leu Arg Arg Phe Gln Lys Gly Gly Glu Gly Ala Pro Arg  
 35 40 45  
 Ala Asp Pro Pro Trp Ala Pro Leu Gly Thr Met Ala Leu Leu Ala Leu  
 50 55 60  
 Leu Leu Val Val Ala Leu Pro Arg Val Trp Thr Asp Ala Asn Xaa Thr  
 65 70 75 80  
 Ala Arg Gln Arg Asp Pro Xaa Asp Ser Gln Arg Thr Asp Glu Gly Asp  
 85 90 95  
 Asn Arg Val Trp Cys His Val Cys Glu Arg Glu Asn Thr Phe Glu Cys  
 100 105 110  
 Gln Asn Pro Arg Arg Cys Lys Trp Thr Glu Pro Tyr Cys Val Ile Ala  
 115 120 125  
 Ala Val Lys Ile Phe Pro Arg Phe Phe Met Val Ala Lys Gln Cys Ser  
 130 135 140  
 Ala Gly Cys Ala Ala Met Glu Arg Pro Lys Pro Glu Glu Lys Arg Phe  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Glu Glu Pro Met Pro Phe Phe Tyr Leu Lys Cys Cys Lys Ile  
 165 170 175  
 Arg Tyr Cys Asn Leu Glu Gly Pro Pro Ile Asn Ser Ser Val Phe Lys  
 180 185 190  
 Glu Tyr Ala Gly Ser Met Gly Glu Ser Cys Gly Gly Leu Trp Leu Ala  
 195 200 205  
 Ile Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ile Ala Ala Gly Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220

55

## Patentansprüche

1. Nucleinsäure,  
5 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie
  - (a) die in SEQ ID NO. 1 dargestellte Nucleotidsequenz  
oder einen Protein-codierenden Abschnitt davon,
  - (b) eine der Sequenz aus (a) im Rahmen der Degeneration  
10 des genetischen Codes entsprechende Nucleotidsequenz  
oder
  - (c) eine mit den Sequenzen aus (a) oder/und (b) unter  
stringenten Bedingungen hybridisierende Nucleotid-  
sequenz umfaßt,15 mit der Maßgabe, daß die Nukleinsäure verschieden ist von  
den Nucleotidsequenzen mit den Zugangsnummern W44613,  
W44574 und g1664579, angegeben in der EMBL EST Datenbank.
2. Nucleinsäure nach Anspruch 1,  
20 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie einen Protein-codierenden Abschnitt der in SEQ ID  
NO. 1 dargestellten Nucleotidsequenz umfaßt.
3. Nucleinsäure nach Anspruch 1,  
25 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie eine Homologie von mehr als 80 % zu der in SEQ ID  
NO. 1 dargestellten Nucleotidsequenz oder einem Abschnitt  
davon aufweist.
- 30 4. Modifizierte Nucleinsäure oder Nucleinsäureanalogon, die  
eine Nucleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 - 3  
umfaßt.
5. Vektor,  
35 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß er mindestens eine Kopie einer Nucleinsäure nach  
einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einen Abschnitt davon

enthält.

6. Vektor nach Anspruch 5,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
5 daß er die Expression der Nucleinsäure in einer geeigneten Wirtszelle ermöglicht.
7. Zelle,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
10 daß sie mit einer Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder einem Vektor nach Anspruch 5 oder 6 transformiert ist.
8. Polypeptid,  
15 **dadurch gekennzeichnet,**  
daß es von einer Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 3 codiert ist, wobei die Maßgabe von Anspruch 1 nicht zu berücksichtigen ist.
- 20 9. Polypeptid nach Anspruch 8,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß es
  - (a) die in SEQ ID NO. 2 dargestellte Aminosäuresequenz von 1 - 223,
  - 25 (b) die in SEQ ID NO. 2 dargestellte Aminosäuresequenz von Aminosäure 59 - 223 oder
  - (b) eine Homologie von mehr als 70% zu einer der Aminosäuresequenzen gemäß (a) oder (b) aufweist.
- 30 10. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 8 oder 9 oder von Fragmenten dieses Polypeptids als Immunogen zur Herstellung von Antikörpern.
11. Antikörper gegen ein Polypeptid nach Anspruch 8 oder 9.

35



- 23 -

12. Antikörper nach Anspruch 11,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß er gegen das gesamte Polypeptid oder gegen eine Peptidsequenz entsprechend den Aminosäuren 1 - 40, 59 - 120  
5 oder 205 - 223 aus SEQ ID NO. 2 gerichtet ist.
13. Modifiziertes Polypeptid, das eine Aminosäuresequenz nach Anspruch 8 oder 9 umfaßt.
- 10 14. Pharmazeutische Zusammensetzung,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie als aktive Komponente umfaßt:  
(a) eine Nucleinsäure nach einem der Ansprüche 1 bis 4,  
wobei die Maßgabe von Anspruch 1 nicht zu berücksichtigen ist,  
15 (b) einen Vektor nach Anspruch 5 oder 6,  
(c) eine Zelle nach Anspruch 7,  
(d) ein Polypeptid nach Anspruch 8, 9 oder 13 oder/und  
(e) einen Antikörper nach Anspruch 11 oder 12.
- 20 15. Zusammensetzung nach Anspruch 14,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß sie weiterhin pharmazeutisch übliche Träger-, Hilfs-  
oder/und Zusatzstoffe enthält.
- 25 16. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 14 oder 15  
zur Diagnostik von Erkrankungen, die mit Störungen des  
Zellzyklus, der Zellaktivierung, der Zellzyklusprogression,  
der DNA-Reparatur, Cytopenien, der Tumorgenese  
30 oder/und der Tumorprogression assoziiert sind.
17. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 14 oder 15  
zur Diagnostik einer Prädisposition für Erkrankungen, die  
mit Störungen des Zellzyklus, der Zellaktivierung, der  
35 Zellzyklusprogression, der DNA-Reparatur, Cytopenien, der  
Tumorgenese oder/und der Tumorprogression assoziiert  
sind.

18. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 14 oder 15 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnostik von Erkrankungen, die mit Störungen des Zellzyklus, der Zellaktivierung, der Zellzyklusprogression, der DNA-Reparatur, Cytopenien, der Tumorgenese oder/und der Tumorprogression assoziiert sind oder eines Mittels für die Diagnostik einer Prädisposition für solche Erkrankungen.
19. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 14 oder 15 zur Herstellung eines Mittels für die Therapie oder Prävention von Erkrankungen, die mit Störungen des Zellzyklus, der Zellaktivierung, der Zellzyklusprogression, der DNA-Reparatur, Cytopenien, der Tumorgenese oder/und der Tumorprogression assoziiert sind.
20. Verwendung nach Anspruch 19 zur Herstellung eines Mittels für die Gentherapie.
21. Verfahren zur Diagnostik von Erkrankungen, die mit Störungen des Zellzyklus, der Zellaktivierung, der Zellzyklusprogression, der DNA-Reparatur, Cytopenien, der Tumorgenese oder/und der Tumorprogression assoziiert sind oder einer Prädisposition für solche Erkrankungen, **dadurch gekennzeichnet,** daß man einen Patienten oder eine aus dem Patienten stammende Probe mit einer Zusammensetzung nach Anspruch 14 oder 15 in Kontakt bringt und die Nucleotidsequenz oder/und die Expression einer Nucleinsäure nach Anspruch 1 bestimmt, wobei die Maßgabe von Anspruch 1 nicht zu berücksichtigen ist.
22. Verfahren zur Therapie oder Prävention von Erkrankungen, die mit Störungen des Zellzyklus, der Zellaktivierung, der Zellzyklusprogression, der DNA-Reparatur, Cytopenien, der Tumorgenese oder/und der Tumorprogression assoziiert sind, **dadurch gekennzeichnet,**

- 25 -

daß man einen Patienten eine Zusammensetzung nach Anspruch 14 oder 15 verabreicht, die die aktive Komponente in einer gegen die Erkrankung wirksamen Menge enthält.

- 5 23. Verfahren zur Identifizierung von Effektoren eines Proteins nach Anspruch 8 oder 9,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man Zellen, die das Protein exprimieren, mit verschiedenen potentiellen Effektorsubstanzen in Kontakt  
10 bringt, und die Zellen auf Veränderungen analysiert.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/01994

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C12Q1/68 C12N5/10 A61K48/00 A61K38/17  
G01N33/50 C07K14/47 C07K16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBL, Zugangsnummer Y10275, H. sapiens mRNA for L-3-phosphoserine phosphatase, Kreiert 15-3-97, XP002077007 see the whole document ---	1,2,4-8
X	EMBL EST, Zugangsnummer W44613, Sequenzkennzeichen zc29d04.r1, 27-Mai-1996, Soares senescent fibroblasts NbHSF Homo sapiens cDNA Klon 323719 5' XP002040596 see the whole document --- -/--	1,3,5



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 September 1998

Date of mailing of the international search report

22/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. .onal Application No

PCT/EP 98/01994

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBL EST, Zugangsnummer g1664579, Sequenzkennzeichen zn68f05.s1, 09-Nov-96, Stratagene HeLa cell s3 937216 Homo sapiens cDNA Klon 563361 3' XP002040597 see the whole document ---	1,3,5
X	EMBL EST, Zugangsnummer W44574, Sequenzkennzeichen zc29d04.s1, 27-Mai-1996, Soares senescent fibroblasts NbHSF Homo sapiens cDNA Klon 323719 3' XP002018662 see the whole document ---	1,3,5
A	WO 93 22435 A (HOSPITAL FOR SICK CHILDREN ;UNITED MEDICAL AND DENTAL SCHO (GB)) 11 November 1993 see the whole document ---	14-24
P,X	COLLET J -F ET AL: "HUMAN L-3-PHOSPHOSERINE PHOSPHATASE: SEQUENCE, EXPRESSION AND EVIDENCE FOR A PHOSPHOENZYME INTERMEDIATE" FEBS LETTERS, vol. 408, no. 3, 26 May 1997, pages 281-284, XP002056286 see the whole document ---	1,2,4-8, 23
E	WO 98 23775 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ;NEES MATTHIAS (DE); DUERST MATTHIAS (DE)) 4 June 1998 see the whole document ---	1,3,5
T	PLANITZER, A. ET AL.: "Identification of a novel c-DNA overexpressed in Fanconi's anemia fibroblasts partially homologous to a putative L-3-phosphoserine-phosphatase" GENE, vol. 210, no. 2, 14 April 1998, pages 297-306, XP002076751 AMSTERDAM NL see the whole document -----	1-24

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP98/01994

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Observation: Although Claim(s) 22 relate(s) to and to the extent that Claim 10 and 21 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter. .onal Application No

PCT/EP 98/01994

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9322435 A	11-11-1993	CA 2134678 A US 5681942 A	11-11-1993 28-10-1997
WO 9823775 A	04-06-1998	DE 19649207 C	26-02-1998

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01994

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/12 C12Q1/68 C12N5/10 A61K48/00 A61K38/17  
G01N33/50 C07K14/47 C07K16/18

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoffgehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EMBL, Zugangsnummer Y10275, H. sapiens mRNA for L-3-phosphoserine phosphatase, Kreiert 15-3-97, XP002077007 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4-8
X	EMBL EST, Zugangsnummer W44613, Sequenzkennzeichen zc29d04.r1, 27-Mai-1996, Soares senescent fibroblasts NbHSF Homo sapiens cDNA Klon 323719 5' XP002040596 siehe das ganze Dokument --- -/--	1,3,5



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. September 1998

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/09/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Chambonnet, F



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01994

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EMBL EST, Zugangsnummer g1664579, Sequenzkennzeichen zn68f05.s1, 09-Nov-96, Stratagene HeLa cell s3 937216 Homo sapiens cDNA Klon 563361 3' XP002040597 siehe das ganze Dokument ---	1,3,5
X	EMBL EST, Zugangsnummer W44574, Sequenzkennzeichen zc29d04.s1, 27-Mai-1996, Soares senescent fibroblasts NbHSF Homo sapiens cDNA Klon 323719 3' XP002018662 siehe das ganze Dokument ---	1,3,5
A	WO 93 22435 A (HOSPITAL FOR SICK CHILDREN ;UNITED MEDICAL AND DENTAL SCHO (GB)) 11. November 1993 siehe das ganze Dokument ---	14-24
P,X	COLLET J -F ET AL: "HUMAN L-3-PHOSPHOSERINE PHOSPHATASE: SEQUENCE, EXPRESSION AND EVIDENCE FOR A PHOSPHOENZYME INTERMEDIATE" FEBS LETTERS, Bd. 408, Nr. 3, 26. Mai 1997, Seiten 281-284, XP002056286 siehe das ganze Dokument ---	1,2,4-8, 23
E	WO 98 23775 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH ;NEES MATTHIAS (DE); DUERST MATTHIAS (DE)) 4. Juni 1998 siehe das ganze Dokument ---	1,3,5
T	PLANITZER, A. ET AL.: "Identification of a novel c-DNA overexpressed in Fanconi's anemia fibroblasts partially homologous to a putative L-3-phosphoserine-phosphatase" GENE, Bd. 210, Nr. 2, 14. April 1998, Seiten 297-306, XP002076751 AMSTERDAM NL siehe das ganze Dokument -----	1-24

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/ 01994

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich   
 **Bemerkung: Obwohl der(die) Ansprüche 22 und soweit die Ansprüche 10 und 21 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.   
 weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden könnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01994

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9322435 A	11-11-1993	CA 2134678 A	11-11-1993
		US 5681942 A	28-10-1997
WO 9823775 A	04-06-1998	DE 19649207 C	26-02-1998

